

## 荧光标记及检测技术在中药大分子活性示踪中的应用

张倩<sup>1,2</sup>, 周秋丽<sup>1</sup>, 胡剑江<sup>2</sup>, 王毅<sup>2\*</sup>

(1. 吉林大学药学院, 长春 130021; 2. 中国中医科学院医学实验中心形态学实验室, 北京 100700)

**[摘要]** 综述了近年来中药大分子荧光标记的方法及应用,探讨了生物光子学检测技术在中药大分子活性示踪中的潜在应用前景,对阐明中药大分子的作用机制、实现对混合未知多组分中药大分子的荧光标记提出新思路,具有重要的意义。

**[关键词]** 中药; 大分子; 荧光探测技术; 生物光子学

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2010)14-0215-06

## Fluorescence Probe, Detective Technology and its Application in Active Tracking of Traditional Chinese Macromolecules

ZHANG Qian<sup>1,2</sup>, ZHOU Qiu-li<sup>1</sup>, HU Jian-jiang<sup>2</sup>, WANG Yi<sup>2\*</sup>

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Jilin University, Changchun 130021, China; 2. The Morphology Lab, Experimental Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** The methods and applications of fluorescence labeling on macromolecules from traditional Chinese medicine (TCM) were reviewed in this paper. Potential application of biophotonic techniques in activity tracing of TCM was discussed. This may clarify the mechanism of macromolecule from TCM and propose new ideas for fluorescence labeling unknown multicomponent of TCM macromolecules.

**[Key words]** traditional Chinese medicine; macromolecules; fluorescence detection; detective; Biophotonics

中药是天然的化学宝库,不但包含各种结构的小分子化合物,而且含有蛋白、多糖、糖肽等大分子成分,在中医理论的指导下多组分共同发挥作用。但由于检测方法的限制,目前几乎没有一项技术可以实现对中药大分子的活性示踪和综合分析。

目前,对小分子化合物的示踪和分析主要依赖各种色谱法,尤其是高效液相色谱法,该方法可稳定、准确、灵敏地对小分子化合物进行示踪和分析<sup>[1]</sup>。然而对于大多数蛋白,多糖等大分子中药成份,由于其分子内缺少特异的检测标志和同生物样本背景中生物大分子的高度相似性,使得分离和检测都极为困难。抗体检测和同位素标记常用做生物大分子的示踪手段<sup>[2]</sup>。抗体检测分析需要制备单一分子的特异抗体,成本高,工作耗时,而且在在大分子活性成分未被确定前,根本不能进行抗体制备和检测,因此难以对中药大分子进行

一一特异标识。

同位素标记法则操作危险<sup>[3]</sup>、半衰期短、费用高、检测时间长、对人体有害、特异性差,不能反映中药大分子在代谢过程中发生的结构变化。因此,中医药研究领域迫切需要一种能有效追踪中药大分子有效成分、代谢途径、作用部位及分子结构变化的可普遍推广的检测方法。

荧光标记及检测技术在最近几年的科学研究中得到了飞速的发展和广泛的应用,它具有高灵敏性、高特异性、高精度等特点,广泛用于蛋白质的活性示踪、细胞内外物质检测、核酸的检测及疾病早期诊断等方面<sup>[4]</sup>。另外,基于非线性光学的探测技术及方法使动态追踪中药大分子结构、分布及浓度变化成为可能。本文针对荧光标记与探测技术在中药大分子中的应用作一综述,以供参考。

### 1 对中药大分子的荧光标记

国内外的研究人员已经对中药大分子中含有的蛋白质、多糖、糖肽等成分进行荧光标记和不同程度的研究,下面将对已经做过的关于中药大分子荧光标记的实例作一概述。

#### 1.1 中药大分子蛋白质的荧光标记

**1.1.1 对天花粉蛋白的标记** 张春阳等<sup>[5]</sup>使用量子点 (quantum dots, QDs) 标记天花粉蛋白 (TCS),使用共价交联

**[收稿日期]** 20100525(001)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(30600842);中国中医科学院基本科研业务费自主选题(zx-zzxt-2006-005)

**[通讯作者]** \* 王毅, Tel: 010-64014411-2560, E-mail: wangyi02@gmail.com

方式形成 QDs-TCS, 将其对质粒 DNA 酶切反应, 通过双光子激发扫描荧光显微镜观察, 得知 QDs-TCS 能进入 JAR 细胞, 机制与 TCS 进入细胞方式相似 (TCS 能以受体介导的内吞方式进入 JAR 细胞, 最终进入细胞质溶胶附着在核糖体)。QDs 共价交联于蛋白后, 吸收偶极发生改变, 但标记后不影响 TCS 的活性, 通过此实验, 设想用 QDs 激发或发射波长不同的荧光探针同时对 JAR 细胞染色, 有望对 TCS 在细胞内的分布进行准确定位。

QDs 又称荧光纳米颗粒, 是指直径在 1 ~ 100 nm 的半导体纳米荧光颗粒<sup>[6]</sup>。国内外的研究工作表明, 与传统的荧光化合物相比, QDs 荧光探针具有如下显著特点: ①发光强度大; ②具有较高的量子产率、较大的 Stokes 位移、优良的稳定性及抗光漂白能力; ③QDs 结构简单, 相对分子质量小, 将其标记在中药大分子上时, 对中药大分子的功能特性影响较小。但是, QDs 在合成以后其表面包裹着疏水的配体覆盖层, 阻碍了其标记功能和生物兼容性, 因此需进行量子点亲水覆盖层处理<sup>[7]</sup>, 如在其外面修饰一层巯基乙酸、羟基二醇等, 其亲水的氨基、羧基、羟基等赋予了量子点水溶性, 且为量子点与生物分子的结合提供了结合位点。按照此种方法, 林章碧等<sup>[8]</sup>将 QDs 直接在水溶液中合成尺度较均一的被巯基丙酸包覆的 DdTe 纳米粒子, 在选定的 pH 条件下, 通过静电相互作用, 使纳米粒子与带正电荷的生物分子-木瓜蛋白酶结合, 通过荧光光谱与透射电镜对标记过程进行监测。此外, QDs 还可以在在其亲水的覆盖层外面结合一类功能分子如亲和素、生物素、抗体等, 从而形成有特异功能的探针。同时, QDs 可以用同一波长的光激发而产生不同颜色的发射光, 从而为同时检测所有标记蛋白质与目标蛋白质之间的相互作用提供了可能<sup>[9]</sup>。但是 QDs 取代传统荧光标记物还有一些必须解决的问题。主要是粒子的大规模合成、均一性和表面修饰的问题。QDs 的合成工艺还有待研究; 对于体内蛋白质的标记中, QDs 点存在不易避免的毒性等问题都不容忽视。

QDs 的这些特点, 可以考虑应用到标记中药大分子的实验中, 使其特异性结合中药大分子的氨基、羧基或巯基, 得到的标记分子可以通过高通量实现过程监测。

**1.1.2 对蜂毒肽的标记** 陈江等<sup>[10]</sup>通过体外合成的蜂毒肽 (Mel) 基因与增强型绿色荧光蛋白 (EGFP) 基因进行融合, 在大肠杆菌中实现高水平表达, 得到纯度和产率满意的 Mel-EGFP 融合蛋白, 并显示明显的抗肝癌效应。Mel-EGFP 融合蛋白主要以可溶性和包涵体 2 种形式存在, 其中以包涵体形式为主, 利用可溶性表达的融合蛋白发出的荧光可直接用荧光显微镜判断 Mel-EGFP 的表达情况; 大部分 Mel-EGFP 表达后在 EGFP 的引导下迅速形成包涵体, 以有效避免被细菌蛋白酶系统的降解; 此外, EGFP 是一个无毒的比较稳定的蛋白, 似乎也能保护融合于 N 端的抗菌短肽 Melittin, 耐受纯化包涵体过程中各种条件的变化, 如超声、变性、复性等而不改变其特性; 用荧光显微镜直接观察纯化的 Mel-EGFP 结合至

肝癌细胞膜表面。Mel-EGFP 破坏肝癌细胞膜的完整性使细胞内的 LDH 释放到培养上清中证实表达的 Mel-EGFP 具有生物学活性。

绿色荧光蛋白质 (GFP) 最初由 Shimomura 等<sup>[11]</sup>在海洋生物水母 *Aequorea victoria* 体内发现。从 20 世纪 90 年代起, GFP 在荧光成像技术中广泛应用于蛋白质的标记和一些其它化合物的活体检测中。并且基于 GFP 的荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 技术是应用最广泛的它可实时动态监测蛋白质时空动力学。作为一种良好的蛋白质荧光探针, GFP 具有使用简单不需任何外加底物或辅助因子、表达几乎不受种属范围的限制、易于得到性质不同的突变体、荧光稳定、无毒性等优点。然而, GFP 由 238 个氨基酸组成, 它较大的体积在活体标记中可能会影响被标记的蛋白质或细胞的正常生理功能。所以, 在使用上还存在一定的限制性。

**1.1.3 对猪脑微管蛋白的标记** 于荣等<sup>[12]</sup>使用罗丹明染料荧光标记猪脑微管蛋白, 标记后将其显微注射于蚕豆叶片下表皮保卫细胞中, 激光扫描共聚焦显微镜下观察发现该荧光标记微管蛋白可以顺利组装到保卫细胞微管骨架上, 5 ~ 10 min 后可清楚观察到整合于保卫细胞中的微管网络, 标记后的蛋白具有高度活性。

罗丹明类染料 (rhodamine dye), 是生物技术中常用的蛋白质分析染料之一, 主要包括 R101、四乙基罗丹明 (RB200) 和羧基四甲基罗丹明 (TAMRA) 等。在标记反应中活性基团大多与 -NH<sub>2</sub> 结合。与荧光素类衍生物相比, 罗丹明类具有更强的光稳定性、更高的荧光产量和更低的 pH 敏感性。

近年来有新合成的荧光标记探针罗丹明 B-N-羧基琥珀酰亚胺酯, 郁美娟等<sup>[13]</sup>对该探针进行了合成研究, 发现其性能稳定, 与氨基酸等含氨基物质进行标记反应时, 条件温和, 方法简单, 标记物稳定且易用色谱分离, 是一种性能优良的新型荧光标记试剂。若待标记的中药大分子中多含有氨基, 可以考虑用罗丹明染料进行标记。

**1.1.4 几种植物凝集素的标记** 异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 是目前应用最广泛的一种荧光素衍生物, 它广泛应用于杂交探针、Edman 降解蛋白质测序及抗体的标记。Fang 等<sup>[14]</sup>为探讨从生殖细胞到精子的发育过程中细胞质膜表面凝集素受体的可能变化, 及其与两类对凝集素标记有不同结果的精子的关系, 用 FITC 荧光素标记伴刀豆凝集素、麦芽凝集素、大豆凝集素, 对蚕豆、鸢尾、朱顶红的生殖细胞质膜表面的凝集素受体标记, 用激光共聚焦扫描显微镜监测 3 种凝集素探针的标记情况, 可以发现在不同植物中均有部分生殖细胞不能被凝集素探针标记, 且在保持尾状形态的生殖细胞表面发现有凝集素受体的极性分布; 同一种凝集素受体在不同物种的生殖细胞上分布不一致, 不同的凝集素受体在同一种植物的生殖细胞上的分布模式也不同。实验中发现的在具尾生殖细胞表面的凝集素受体极性分布的现象, 为探讨精细胞功能及其表面糖蛋白分布

的可能差异提供了重要启示。

在上面实验中, FITC 实现在同时对多组分蛋白质的标记, 在标记中药大分子的实验中, 目标即为多组分的蛋白质、多糖等大分子成分, 所以 FITC 荧光探针有一定的可行性, 具体应用还有待于进一步研究。

**1.1.5 对酪丝亮肽的标记** 简序等<sup>[15]</sup>应用 5(6)-羧基四甲基罗丹明琥珀酰亚胺酯对实现酪丝亮肽(YSL)的示踪标记。用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳、毛细管电泳和荧光分光光度法对标记 YSL 进行纯化和鉴定。并在激光扫描共聚焦显微镜下观察了荧光标记 YSL 在人肝癌 BEL-7402 细胞中的分布。

四甲基罗丹明琥珀酰亚胺酯属于罗丹明类的有机荧光染料, 可以与氨基酸的氨基稳定结合, 具有光稳定性好、对 pH 不敏感、较宽的波长范围和较高的荧光量子产率等优点。因而选用该物质来标记 YSL 的游离氨基以达到示踪的目的。

## 1.2 中药大分子多糖的荧光标记

**1.2.1 对壳聚糖的标记** 高贵珍等<sup>[16]</sup>选用用茜素红(ARS)作为生物探针, 运用荧光光谱法研究了其与壳聚糖(CTS)的相互作用机制, 测定了结合常数、结合位点数, 并根据 CTS 对 ARS 的荧光强度具有猝灭作用, 且成线性关系, 建立了一种测定 CTS 含量的荧光猝灭法。此研究有助于从分子水平的角度认识多糖分子与小分子之间相互作用的机制, 为生命科学、医学、药物分析研究提供有用的信息和方法。

任东文等<sup>[17]</sup>使用异硫氰酸荧光素(FITC)标记 CTS, FITC 与 CTS 氨基反应, 标记后的 CTS 在一定波长激发光的作用下, 发出强烈的绿色荧光, 可用于研究 CTS 的体内代谢和分布、CTS 与小肠黏膜的作用以及 CTS 微粒的吸收。此种方法具有很多优点: 荧光探针 FITC 标记后的 CTS 在激光共聚焦显微镜和荧光显微镜下清晰可见, 因此使得 CTS 微粒囊、微粒或微粒的定位变得容易; 荧光的检测敏感性比传统紫外-可见方法高 3~4 个数量级, 因此使得 CTS 的检测和定量更加准确<sup>[18]</sup>。

**1.2.2 对硫酸皮肤素的标记** 溴代十六烷基吡啶是阳离子表面活性剂, 在水溶液中以阳离子形式存在, 而硫酸皮肤素由于羧基离解而以阴离子形式存在, 两者形成大离子缔合物。利用这个原理, 王祥洪等<sup>[19]</sup>用溴代十六烷基吡啶标记硫酸皮肤素, 标记后硫酸皮肤素的共振瑞利散射结果大大增强并产生新的 RRS 光谱。此方法简便、快速, 分析的灵敏度较高, 选择性较好。

**1.2.3 对硫酸多糖 911 的标记** 李福川等<sup>[20]</sup>利用多糖及寡糖具有还原性末端的特点, 将硫酸多糖(911)还原性末端的半缩醛基, 通过还原胺化反应与酪胺(Tyr)的氨基共价偶联, 911-Tyr 中酪胺引入的仲氨基通过与异硫氰酸酯荧光素(FITC)进行亲核反应, 实现对 911 还原末端的选择性荧光标记, 并使用 UV-Vis 吸收光谱<sup>1</sup>HNMR 和 HPSEC 对偶联与标记结果进行确证。该法适用于具有还原末端的多糖及寡糖的荧光标记。911-Tyr 中酪胺引入的仲氨基, 在弱碱性条件下

可与 FITC 的异硫氰酸中氰基发生亲核反应, 生成 911-Tyr-FITC, 达到对 911 标记的目的。

由于采用的是 911 末端选择性标记, 对 911 的抗凝活性无明显影响, 也无明显的细胞毒性(通过细胞毒性实验观察发现对胸腺细胞和脾细胞均无明显的细胞毒性)。虽然报道中说氨基极易与 FITC 发生共价结合<sup>[21]</sup>, 但 FITC 与 911-Tyr 之间的共价偶联, 在<sup>1</sup>HNMR 谱中仅能得到部分确证。所以, 此方法的标记效率还有待提高。

**1.2.4 对氨基葡甘露聚糖的标记** 郭渊等<sup>[22]</sup>用荧光胺标记氨基葡甘露聚糖, 将标记所得的荧光衍生物与外周血单个核细胞(PBMC)和 HepG2 细胞在 CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育, 然后用荧光显微镜(紫光作激发光)观察。结果 PBMC 和 HepG2 细胞内均出现靛色荧光, 从而证明了氨基葡甘露聚糖能跨细胞膜转运进入细胞内。

实验证明用荧光胺示踪氨基糖链的跨细胞膜转运具有简便易行、灵敏度高、选择性强等优点, 是一种直观研究氨基糖链的跨膜转运和了解其生物功能的有效手段。同时荧光胺对氨基糖链标记方法的建立对研究氨基糖链的结构也具有重要意义, 如荧光胺柱前衍生氨基糖链能提高测定氨基糖链结构的灵敏度。

实验中所用到的荧光胺是一种常用的荧光生试剂, 试剂本身不发荧光, 但可同伯氨基化合物的伯氨基反应, 两者共价结合; 生成的荧光衍生物不仅具有高荧光强度, 而且具有良好的选择性(荧光胺只有同伯氨基反应才生成荧光衍生物)。没有与伯氨基反应的荧光胺则迅速水解为不发荧光的物质反应体系的相对荧光强度是 36.6, 说明荧光胺同含伯氨基反应生成了荧光衍生物, 标记成功。

**1.2.5 对克氏螯虾壳聚糖的标记** 朱旭明<sup>[23]</sup>用 5(6)-羧-四甲基罗丹明-5-马来酰亚胺按不同比例标记克氏螯虾壳聚糖, 检测标记后克氏螯虾壳聚糖对大肠埃希菌及金黄色葡萄球菌的抗菌效果, 用激光共聚焦显微镜观察壳聚糖对试验菌的作用靶位, 结果控制荧光标记克氏螯虾壳聚糖抗菌活性基团的比例, 不影响其抗菌活性, 可作为一种荧光探针, 用于克氏螯虾壳聚糖抗菌作用靶位的研究。

**1.2.6 对褐藻聚糖的标记** 为了研究肝素在发挥抗凝活性时 IXa 抗凝活酶的抑制作用, Sandrine M 等<sup>[24]</sup>发现在没有多糖的情况下, 加入肝素、依诺肝素等会影响 IXa 的抗凝率, 而加入褐藻聚糖后, IXa 的抗凝率增加了 23 倍, 所以用一种荧光素与褐藻聚糖共价结合实现标记后, 褐藻聚糖与催化剂-抑制剂或酶-抑制剂作用, 通过荧光各向异度成像观测褐藻聚糖与抗凝活酶、肝素辅因子 II、凝血酶和 IXa 抗凝活酶的相互作用, 结果褐藻聚糖与肝素辅因子 II 有很高的亲和力。实验证明发挥肝素的抗凝作用, 加入多糖(褐藻聚糖)以中和无活性的酶-抑制剂, 可以大大提高抗凝率。

## 2 中药大分子荧光标记的中常用检测技术

**2.1 荧光显微镜** 普通荧光显微镜(fluorescence microscope)是荧光细胞化学的基本工具, 可以对荧光标记的

物质进行观察与初步定位,与放射性同位素标记相比,在对被测物质进行准确定位的同时,其安全性又大为提高。但是普通荧光显微镜灵敏度较低,不能定量的给出图像发光的强度数值。随着现代生物学的发展,要求荧光显微镜给出一定精度定量数据,定量分析细胞内荧光物质的发光强度和空间分布,以满足研究生物体中细微变化的需要。

在普通荧光显微镜上配置光子检测系统和计算机处理控制系统就构成了显微荧光分光光度检测系统,能够对样品进行原位荧光光谱分析<sup>[25]</sup>,即利用荧光显微镜获得的荧光图像经过光谱融合处理后得到光谱图像,其中每一点都记录着相应点在不同波长激发下的全部荧光信息,可以方便的获取任意一点的光谱曲线。

**2.2 激光扫描共聚焦显微镜成像技术** 激光扫描共聚焦显微镜(laser scanning confocal microscope, LSCM)是在荧光显微镜成像基础上加装了激光扫描装置,并在光路中加光学滤波器共聚焦成像,后利用计算机进行图像处理,从而得到细胞或组织内部高分辨微细结构的荧光图像<sup>[26]</sup>。LSCM 在定量荧光测量、动态荧光测定、细胞学定位、细胞膜流动性以及各种离子的含量测定等方面被广泛应用。

**2.3 荧光共振能量转移技术** 荧光共振能量转移技术(fluorescence resonance energy transfer, FRET),是蛋白质荧光标记中比较常用的一种技术,它是指 2 个荧光发色基团在足够靠近时,当供体分子吸收一定频率的光子后被激发到更高的电子能态,在该电子回到基态前,通过偶极子相互作用,实现了能量向邻近的受体分子转移,即发生能量共振转移<sup>[27]</sup>。FRET 程度与供、受体分子的空间距离紧密相关,一般为 7~10 nm 时即可发生 FRET;随着距离延长,FRET 呈显著减弱。利用 FRET 成像可克服荧光显微镜本身空间分辨率低的局限,观测到细胞中纳米尺度上生物分子构象变化和相互作用过程等。FRET 也存在一些缺点如易发生荧光淬灭等,在实验中通过选择合适的荧光探针,严格控制实验条件在一定程度上加以避免<sup>[28]</sup>。

**2.4 双光子激发荧光成像技术** 双光子激发荧光成像是一种新型的三维荧光成像方法,在激光照射下,基态荧光分子或原子同时吸收 2 个光子而成激发态,即双光子激发过程<sup>[29]</sup>。双光子激发荧光成像技术用飞秒激光的极高光子密度实现了双光子荧光的非线性激发,空间分辨率高,穿透深度大。由于只有焦点处的荧光染料被激发,且每个激发光子的能量低,所以双光子激发荧光的光漂白小、光毒性小,能对细胞中荧光探针标记的蛋白质分子、离子进行长时间四维(空间三维、时间一维)动态观察,是一种探索细胞内生命过程的很好的手段。该方法可探测荧光分子所处的微观环境的流动性,荧光标记的生物大分子体积、形状、质量的变化等等。这些信息对了解生命过程,特别是为在活细胞及整体层次动态观测蛋白相对质分子质量的变化是一种新的、有效的研究手段。

**2.5 双光子激发荧光各向异性度成像** 偏振光是指只包含

了单一方向光波的光束。在偏振光的激发下,很多样品所发射的荧光在不同方向的偏振分量也不同,对于一个包含大量各向同性取向荧光分子的体系,一般在激发光的偏振方向上分量最大,这种现象称为荧光的各向异性<sup>[30]</sup>。荧光各向异性度的测量可以获得荧光分子的转动速度的信息,从而了解相对分子质量、分子结构等信息。

**2.6 荧光关联谱技术** 荧光关联谱(FCS)是研究极低浓度生物分子动力学的一种光学技术,具有高时空分辨的优点,是荧光强度统计波动的相关分析。它通过把激光光束会聚到样品上,激发特定区域的荧光。由于荧光分子或粒子的布朗扩散或化学反应,使得激发区域内粒子在其平衡浓度的波动造成荧光强度的波动。荧光关联谱关注的不是荧光强度而是荧光强度的波动,可检测生物分子的扩散系数、化学反应速率常数、分子的聚集和翻转动态变化等多种参数<sup>[31]</sup>。LSCM 和高灵敏度检测器的应用使利用 FCS 研究细胞膜上生物单分子的扩测成为可能。

**2.7 二次谐波成像技术** 二次谐波成像技术是最近发展起来的激光扫描非线性光学显微术。它利用超快激光脉冲与介质相互作用产生的倍频相干辐射作为图像信号来源,具有高分辨、高对比度的三维成像能力<sup>[32]</sup>。同双光子激发荧光测量相同,采用近红外光作为激发光源,激发效率同激光光强的平方成正比,因此具有双光子激发荧光成像所具有的许多优点,如:对生物样品的杀伤作用小,在高散射体中的穿透能力强,探测深度比较大等。二次谐波反映样品本身的非线性光学性质,一般不需要用染料进行标记,可避免染料及其光化学产物带来的毒性。该成像方法适合对活体进行动态测量,在生物医学研究领域具有广阔的应用前景。

以上介绍的是利用生物光子学的原理对中药大分子进行荧光标记时可能用到的检测技术,包括一些常规的和新兴的技术,然而在实际实验操作中,仍需要借助一些其他学科的相关原理和技术,如高效液相色谱技术、毛细管电泳技术、荧光分光光度法等<sup>[13]</sup>和一些生物化学及分子生物学的相关原理。通过这些技术原理相结合,从而更好的对荧光标记和标记后的过程进行监测。

### 3 总结

本文基于近年来飞速发展的荧光标记及检测技术,考虑中药大分子活性示踪和综合分析存在的困难,提出新的示踪方法,旨在选择合适的荧光探针及检测技术实现对中药大分子的荧光标记及活性示踪,拟采用荧光探针标记中药大分子,借助生物光子学的技术手段,可以使用激光扫描共聚焦显微成像技术(LSCM)用于动态观测整个标记过程,并进行定量荧光测量和动态荧光测定;利用荧光关联谱(FCS)技术激发特定区域的荧光;双光子激发荧光各向异性度成像则用来荧光分子体积的差异,也有可能应用于活细胞环境中,直接观测荧光标记的中药大分子结构变化或结合、断裂等牵涉到分子质量变化的生物化学过程,为普通双光子激发扫描成像增加新的探测指标;而二次谐波技术期望与双光子激发扫描

成像和共聚焦显微成像等技术结合,实现对活体动态测量。所有技术其可行性还有待于进一步研究。由于目前已有的标记技术均是对单一组分已知结构分子进行标记,没有对中药大分子混合未知多组分的标记技术研究,所以本文对中药大分子的示踪和分析研究可以实现对中药大分子进入体内后其活性物质的检测和药物代谢吸收分布情况的剖析,为阐明药物作用机制、开发新药等工作奠定基础。

### [参考文献]

[1] Wang Y, Zhao X, Zhong J, et al. Simple determination of pirfenidone in rat plasma via high-performance liquid chromatography [J]. *Biomed Chromatogr*, 2006, 20 (12):1375.

[2] 刘厚奇, 向正华. 原位检测技术 [M]. 北京:人民军医出版社, 2002:74.

[3] Nilsson Ehle P, Schotz M C. A stable, radioactive substrate emulsion for assay of lipoprotein lipase [J]. *J Lipid Res*, 1976, 17:536.

[4] 陈中举, 张燕玲, 黄金璜. 荧光标记生物大分子及其应用 [J]. *国外医学·生物医学工程分册*, 2004, 27 (6):348.

[5] 张春阳, 马辉, 丁尧, 等. 量子点标记天花粉蛋白的研究 [J]. *高等学校化学学报*, 2001, 22(1):34.

[6] Palomo J M, Cramer J, Seitz O. Diels-Alder ligation of peptides and proteins [J]. *Chem Eur J*, 2006, 12(23):6095.

[7] Mayer K, Meyer S, Reinholz-Muhly M, et al. Shorttime infusion of fish oil-based lipid emulsions, approved for parenteral nutrition, reduces monocyte proinflammatory cytokine generation and adhesive interaction with endothelium in humans [J]. *J Immunol*, 2003, 171 (9):4837.

[8] 林章碧, 张皓, 陈奇丹, 等. 利用水相合成的量子点标记木瓜蛋白酶的研究 [J]. *高等学校化学学报*, 2003, 4, 24(4):609.

[9] Han M, Gao X, Nie S. Quantum-dot-tagged microbeads for multiplexed optical coding of biomolecules [J]. *Nature Biotechnology*, 2001, 19(7):631.

[10] 陈江, 王炜煜, 卢志贤, 等. 绿色荧光蛋白标记蜂毒肽的表达及其抗肝癌效应的初步评价 [J]. *中华肝病病杂志*, 2006, 14(11):847.

[11] Shimomura O, Johnson F H, Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa *Aequorea* [J]. *J Cell Comp Physiol*, 1962, 59:223.

[12] 于荣, 袁明, 王学臣. 微管蛋白荧光探针的制备及其在蚕豆叶片保卫细胞中的组装 [J]. *农业生物技术学*

报, 2004, 12(1):48.

[13] 郁美娟, 张海凤, 赖奕坚, 等. 新型罗丹明类荧光标记探针的研究 (II) [J]. *染料与染色*, 2004, 41(5):249.

[14] Fang K F, Sun M X, Zhou C. Probing lectin receptors on the plasma membrane of isolated viable generative cells in Angiosperms by means of single cell manipulation [J]. *Acta Botanica Sinica*, 2003, 45 (11):1373.

[15] 简序, 傅正, 张燕玲, 等. 酪丝亮肽荧光标记物的合成及其在肿瘤治疗靶点研究中的应用 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2008, 35(10):1161.

[16] 高贵珍, 陈雷, 丁一磊. 荧光法研究茜素红 S 与壳聚糖作用机理及其应用 [J]. *生物学杂志*, 2004, 21 (6):25.

[17] 任东文, 刘袖洞, 马小军. 荧光标记壳聚糖的反应动力学研究 [J]. *功能材料*, 2004, (35):2463.

[18] Anette Brunner, Yoshiharn Minamitake, Achim Gopferich. Labelling peptides with fluorescent probes for incorporation into degradable polymers [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 1998, 45:265.

[19] 王祥洪, 张世娜, 刘江涛. 溴代十六烷基吡啶光谱探针 RRS 法测定硫酸皮肤素 [J]. *化学研究与应用*, 2009, 21(3):312.

[20] 李福川, 耿美玉, 李英霞, 等. 海洋硫酸多糖 911 的荧光标记研究 [J]. *高等学校化学学报*, 2002(23):1704.

[21] Malsch R, Guerrini M, Torri G, et al. *Anal Biochem* [J], 1994, 217:255.

[22] 郭渊, 刘永康, 杜莹, 等. 荧光胺示踪氨基葡甘露聚糖的跨细胞膜能力与转运机制 [J]. *第三军医大学学报*, 2007, 29(12):1152.

[23] 朱旭明, 张燕玲, 郑铁生. 克氏螯虾壳聚糖的荧光标记及其抗菌活性的研究 [J]. *世界科技研究与发展*, 2008, 30(6):703.

[24] Sandrine M, Emmanuelle R, Jean-Claude T, et al. Mechanism of factor IXa inhibition by antithrombin in the presence of unfractionated and low molecular weight heparins and fucoidan [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1998, 1387:184.

[25] 范世福, 张思祥, 肖松山. 自制显微荧光光度系统及其应用 [J]. *细胞生物学杂志*, 1998, 20 (4):189.

[26] 周丽华, 黄光文. 激光扫描共聚焦显微镜在植物学中的应用 [J]. *激光生物学报*, 2005, 14 (1):76.

[27] Guignet EG, Hovius R, Vogel H. Reversible site-selective labeling of membrane proteins in live cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(4):440.

- [28] Hideo T, Kazuya K, Yasuteru U, et al. A Novel design method of ratiometric fluorescent probes based on fluorescence resonance energy transfer switching by spectral overlap integral [J]. Chem Eur J, 2003, 9: 1479.
- [29] 汪洁, 梁瑞生, 唐志列, 等. 双光子技术在生物医学中的应用与研究进展 [J]. 中国医学物理学杂志, 2002, 19(3):148.
- [30] 汪雪峰, 王毅, 蒋艳, 等. 双光子激发荧光各向异性度的成像 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2005, 32(2):161.
- [31] Goedhart J, Hink M A, Visser A J, et al. *In vivo* fluorescence correlation microscopy (FCM) reveals accumulation and immobilization of Nod factors in root hair cell walls [J]. Plant J, 2000, 21:109.
- [32] 庄正飞, 郭周义, 刘汉平, 等. 二次谐波成像技术 [J]. 激光生物学报, 2008, 17(1):128.

[责任编辑 邹晓翠]

(上接第 214 页)

- [29] 赵大洲, 陈继洲, 秦勇, 等. 中华大蟾蜍蟾酥与蟾皮化学成分的比较分析 [J]. 天津药学. 2006, 18(4):21.
- [30] 臧庶声. 花背蟾蜍耳后腺分泌物化学成分的研究 [J]. 兰州医学院学报. 1991, 17(4):196.
- [31] 代丽萍. 蟾蜍皮水溶性部位化学研究 [D]. 河南中医学院 2001 级硕士研究生毕业论文:15.
- [32] 曹徐涛, 王东, 王娜, 等. Water-soluble Constituents from the Skin of *Bufo bufo farfarizans* Cantor [J]. 中国天然药物. 2009, 7(3):183.
- [33] Verpoorte R. Phan-quoc-Kinh, Svendsen A. B. J. of Ethnopharmacology, 1979, 1:197.
- [34] 徐乃玉, 顾振纶. 中华大蟾蜍皮无机元素初步分析 [J]. 中成药, 2003, 25(9):7.

[责任编辑 顾雪竹]